

### III. BAHAN DAN METODE

#### 3.1 Waktu dan Tempat

Tempat penelitian dilaksanakan di Laboratorium Agronomi Universitas Muhammadiyah Malang selama kurun waktu 6 bulan. Analisis GC-MS dilakukan di Fakultas FMIPA Universitas Gajah Mada Yogyakarta. Penelitian ini berlangsung dari bulan Desember sampai April 2020.

#### 3.2 Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan adalah etanol, aquades, daun tanaman mama ungu, isolat bakteri *R. solanacearum*, *Xanthomonas* sp. dan *E. carotovora* media NA (*Nutrient agar*) digunakan untuk uji daya hambar bakteri patogen *R. solanacearum*, *Xanthomonas* sp. dan *E. carotovora* dengan komposisi: 39 g *nutrient agar* dan 100 ml *aquades* (Cahyani, 2014) dan media NB (*Nutrient bort*) sintesis digunakan untuk memperbanyak biakan murni dengan komposisi 13 g *nutrient bort* dan 1000 ml *aquades*, ekstrak maman ungu dengan konsentrasi 50%, 75% dan 100%, plastic wrap, kertas buffalo hitam, alumunium foil dan alkohol 70%

Alat yang digunakan adalah peralatan isolasi patogen skapel, bunsen, tabung reaksi, mikroskop, pinset, jarum ose, preparat, *colony counter*, penggaris, LAF, autoclave, shaker dan erlenmeyer, peralatan untuk uji daya hambat meliputi cawan petridish, kertas sarung, gelas ukur, beaker glass, timbangan analitik, jangka sorong, kamera untuk dokumentasi, peralatan pembuatan ekstrak maman ungu meliputi gunting, blender, sentrifuge, vortex, pipet ukur, shaker, mikropipet, mikroskop dan alat uji GC-MS.

### 3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium yang menggunakan metode difusi agar / *Kirby Bouer* menggunakan kertas saring ditetesi ekstrak daun mamon ungu pada media *nutrient agar*. Metode *Kirby Bouer* lebih sering digunakan dalam mengamati diameter zona hambat ekstrak tertentu dan menghasilkan pertumbuhan dari sifat bakteri yang paling patogen (Hasibuan, 2016).

Rancangan penelitian yang digunakan yaitu rancangan acak lengkap afktroial. Faktor 1 adalah jenis bakteri (K) yaitu K1= *R. solanacearum*, K2= *Xanthomonas* sp. Dan K3= *E. carotovora* dan Faktor kedua adalah konsentrasi ekstrak mamon ungu (P) P0= kontrol, P1= 50%, P2= 75%, P3= 100%. Semua perlakuan diulang sebanyak 3 kali sehingga diperoleh  $3 \times 4 \times 3 = 36$  satuan percobaan yang ditanam di media nutrient agar pada petridish. Data yang diperoleh dimasukkan ke tabel ANOVA dan analisis dengan uji BNJ 5% Adapun kombinasi perlakuan dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Kombinasi Perlakuan antara Konsentrasi Ekstrak dan Jenis Bakteri Patogen

	P0	P1	P2	P3
K1	K1P0	K1P1	K1P2	K1P3
K2	K2P0	K2P1	K2P2	K2P3
K3	K3P0	K3P1	K3P2	K3P3

Keterangan:

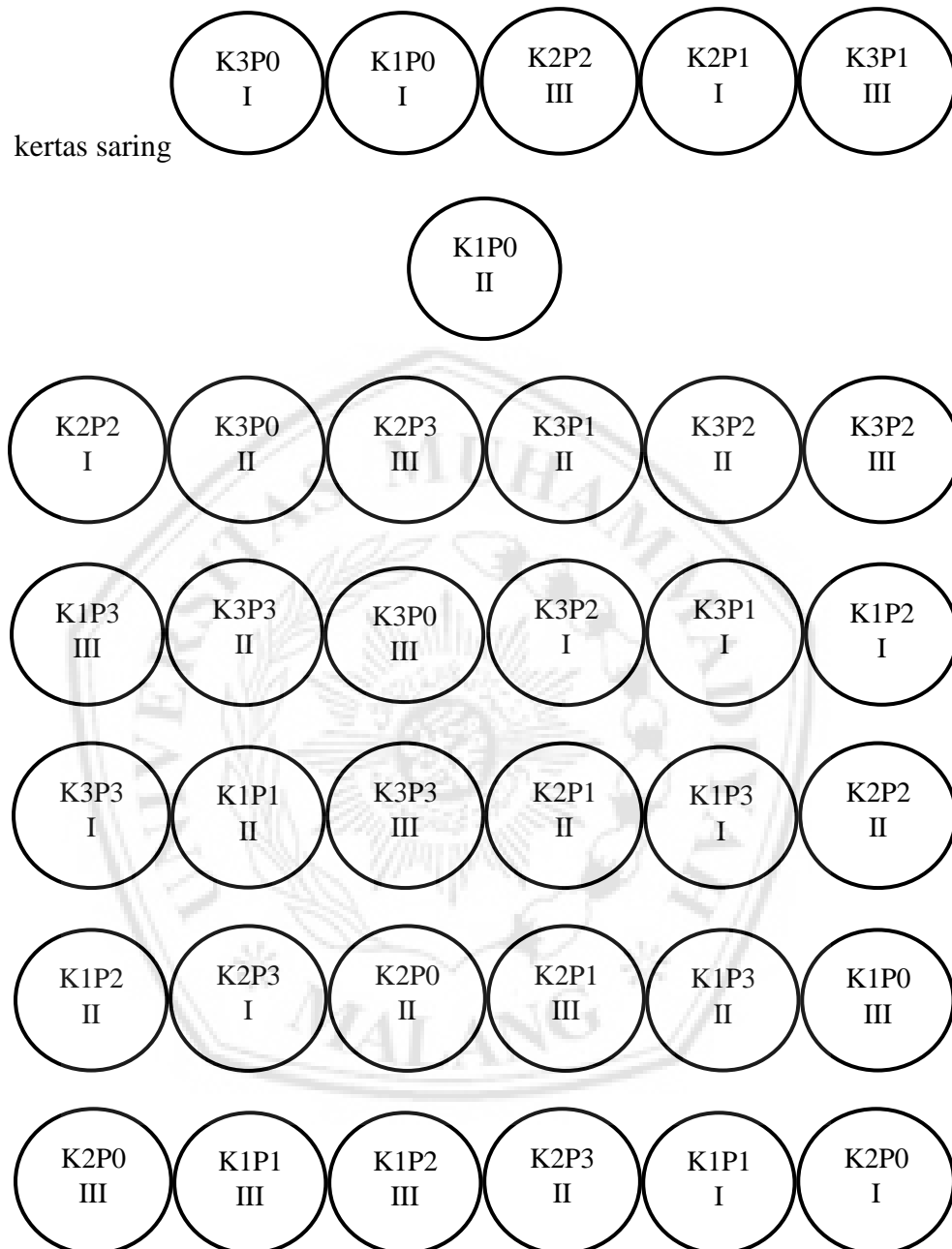
Faktor 1: Jenis Bakteri (K)

- *R. solanacearum* (K1)
- *Xanthomonas* sp (K2)
- *E. carotovora* (K3)

Faktor 2 : Konsentrasi Ekstrak Daun Mamon Ungu (P)

- Kontrol (P0)
- Konsentrasi 50%: 1 ml ekstrak daun mamon ungu + 1 ml aquades (P1)
- Konsentrasi 75%: 1.5 ml ekstrak daun mamon ungu + 0.5 ml aquades (P2)
- Konsentrasi 100% : 2 ml ekstrak daun mamon ungu (P3)

Metode uji daya hambat aktivitas antibakteri seperti penelitian Manaroinsong (2015) menggunakan metode modifikasi Kirby-Bauer dengan menggunakan



Keterangan :

I :Ulangan 1

II :Ulangan 2

III :Ulangan 3

K1, K2 dan K3 : Jenis Bakteri Patogen (Faktor 1)

P0, P1, P2 dan P3 : Konsentrasi Ekstrak Daun Maman Ungu (Faktor 2)

Gambar 3. Denah Posisi Perlakuan Uji Aktivitas Antibakteri Daun Maman Ungu Terhadap Beberapa Bakteri Patoge

### 3.4 Pelaksanaan Penelitian

Penelitian dilakukan dengan tahapan sebagai berikut:

#### 3.4.1 Persiapan Alat, Media Perbanyakan dan Peremajaan Bakteri Patogen

##### 1. Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat yang akan digunakan sebelum semua peralatan digunakan yaitu dengan cara membungkus semua peralatan menggunakan kertas kemudian dimasukkan dalam autoclaf pada suhu 121°C. Sebelum sterilisasi, semua peralatan dicuci terlebih dahulu dengan air mengalir. Sedangkan media tanam untuk media tumbuh dan perbanyakan bakteri *R. solanacearum*, *Xanthomonas* sp. dan *E. carotovora* disterilisasi dengan autoclave pada suhu 121°C, 1 atm selama 15 menit.

##### 2. Pembuatan media

Adapun media tumbuh untuk bakteri *R. solanacearum*, *Xanthomonas* sp. dan *E. carotovora* terdiri dari:

- a. Media NB digunakan untuk memperbanyak isolat bakteri *R. solanacearum*, *Xanthomonas* sp. dan *E. carotovora* yang nantinya digunakan untuk perlakuan uji daya hambat. Media yang digunakan adalah *nutrient bort* dengan komposisi 13 g *nutrient bort* dalam 1000 ml aquades. Semua komposisi dicampur hingga homogen didalam beaker glass 1000 ml dan dimasukkan kedalam Erlenmeyer, bagian Erlenmeyer ditutup dengan kapas dan dibungkus dengan aluminium foil kemudian disterilisasi.
- b. Media NA sebagai medium tumbuh bakteri *R. solanacearum*, *Xanthomonas* sp. dan *E. carotovora* pada uji daya hambat. Media *nutrient*

*agar* disiapkan dengan cara mencampurkan *nutrient agar* sebanyak 28 g kedalam 1.000 ml *aquades* lalu diaduk rata dan kemudian direbus sampai mendidih untuk melarutkan bubuk NA. Setelah itu, tabung erlenmeyer yang berisi media dimasukkan ke dalam plastik tahan panas dan disterilkan pada suhu 121°C dan tekanan 1atm. Selanjutnya, media dikeluarkan dari dalam autoklaf, ditunggu sampai agak dingin dan dituangkan ke dalam cawan petri secara aseptik di dalam *laminar air flow*.

### 3.4.2 Penyiapan Isolat Bakteri Patogen

Biakan murni bakteri *R. solanacearum* dan *Xanthomonas* sp. yang didapatkan dari Balitsa Lembang pada tabung reaksi diambil dengan menggunakan ose lalu ditanam dalam media NA dengan cara menggorekan koloni tunggal secara zigzag pada media yang sudah padat, selanjutnya media diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C. Media *Nutrient Agar* (NA) digunakan untuk mengisolasi inokulum yang diinkubasikan selama 3 hari. Biakan murni bakteri disimpan pada media agar pada suhu 20–25°C agar terhindar dari kontaminasi.

Isolat bakteri *E. carotovora* didapatkan dengan mengisolasi umbi wortel yang memiliki gejala busuk hitam dan berlendir. Kemudian didapatkan isolat murni dilakukan perbanyakan dengan di gores pada medium agar dengan bentuk kuadran dimana setiap goresan yang satu harus bersambung dengan goresan berikutnya sehingga pada goresan terakhir diharapkan mikroba tumbuh membentuk satu koloni yang berasal dari satu sel dan terpisah dari koloni lainya (Maryanto & Kurniaawan, 2015). Isolat murni yang didapatkan kemudian dilakukan identifikasi secara mikroskopis menggunakan mikroskop.

### 3.4.4 Perhitungan Pertumbuhan dan Kepadatan Bakteri *R. solanacearum*, *Xanthomonas sp.* dan *E. carotovora*

#### 3.4.4.1 Menghitung Kepadatan Bakteri Menggunakan Metode Spread Plate

1. Menyiapkan larutan
2. Memberi label pengenceran pada tube.
3. Mengambil 100  $\mu$ l suspensi bakteri *R. solanacearum*, *Xanthomonas sp.* dan *E. carotovora* menggunakan mikropipet, sebelum di ambil di shaker terlebih dahulu.
4. Kemudian memasukkan kedalam tube pengenceran kedua dan di vortex kembali. Kemudian mengambil kembali sebanyak 100  $\mu$ l dan dimasukkan ke tube pengenceran ketiga dan seterusnya sampai pada tahap pengenceran ke-6
5. Setelah itu ratakan isolat diatas permukaan media nutrient agar
6. Kemudian di inkubasi selama 24 jam dengan suhu 32°C setelah itu mengamati pertumbuhan dan menghitung koloni menggunakan *colony counter*.
7. Kemudian setelah diketahui jumlah koloni dilanjutkan dengan menghitung kepadatan bakteri pada masing-masing tingkat pengenceran di setiap semua perlakuan. Kemudian jumlah bakteri dihitung menggunakan rumus  $CFU/ml = (Jumlah\ bakteri\ Fp) / V(inokulasi\ ke\ cawan)$  Anggraeni (2012)

### 3.4.5 Uji Patogenesis

Uji pendahuluan dilakukan yaitu uji patogenesis.

- a. Uji patogenesis pada bakteri *Ralstonia solanacearum* dan *Xanthomonas sp* pada tanaman tomat.
  1. Menyiapkan suspensi bakteri dengan kepadatan  $10^7$  dan  $10^8$  cfu/ml.

2. Menyiapkan tanaman tomat yang berumur 21 hari setelah semai kemudian memberi label tanaman kontrol dan ulangan. Suspensi diinjeksi sebanyak 50 ml/tanaman dengan cara mengambil 1 ml suspensi kemudian ditambahkan aquades sampai 50ml kemudian menyiram suspensi media tanam di sekitar tanaman uji. Menurut Hartati dan Karyati (2014 dalam Hartati *et al*, 2015) metode inokulasi dengan penyiraman *R.solanacearum* pada tanah disekitar tanaman uji yang akarnya telah dilukai terlebih dahulu adalah yang paling efektif dan stabil dalam menimbulkan gejala layu pada tanaman.
3. Mengamati gejala yang ditimbulkan.
- b. Uji patogenesis pada bakteri *Erwinia carotovora* pada umbi wortel.
  1. Menyiapkan suspensi bakteri dengan kepadatan  $10^{-7}$  dan  $10^{-8}$  cfu/ml.
  2. Menyiapkan umbi wortel. Umbi wortel dipotong dan dibersihkan hingga steril.
  3. Mengambil 20 $\mu$ l dengan mikropipet kemudian disuntikkan ke permukaan umbi wortel pada 6 spot yang berbeda
  4. Memberi label antara yang kontrol dan yang ditetaskan
  5. Mengamati gejala yang timbul.

#### **3.4.6 Uji Aktivitas Anti Bakteri Ekstrak Daun Maman Ungu**

Pengujian ekstrak daun maman ungu dilakukan dengan beberapa tingkat konsentrasi yaitu 0% (kontrol), 50%, 75% dan 100%. Meletakkan 3 cakram kertas berdiameter 0,5 cm yang telah diberi masing-masing bakteri uji: *R. solanacearum*, *Xanthomonas* sp. dan *E. carotovora* yang telah direndam 5-10 menit pada cawan petri yang telah di beri media NA dan konsentrasi ekstrak maman ungu yang

berbeda. Ekstrak daun mangan ungu diujikan pada 3 bakteri uji petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 – 24 jam. Pengamatan aktivitas antibakteri dilakukan berdasarkan Diameter Daerah Hambatan (DDH) yang terbentuk dan diukur dengan menggunakan jangka sorong (Hamdiyati dkk., 2008).

#### **A. Persiapan Media Kultur**

1. Media yang digunakan adalah media *nutrient agar* yang sebelumnya sudah diseri terlebih dahulu pada suhu 121°C 1 atm selama 15 menit
2. Jika sudah memadat stok media yang ada pada erlenmeyer maka di cairkan kembali menggunakan microwave
3. Media diambil dari stok pada erlenmeyer sebanyak 20 ml dengan menuangkan media kedalam tiap petridish di dalam *laminar air flow* (LAF)/
4. Setelah itu menyimpan media kultur di rak.

#### **B. Ekstraksi Daun mangan Ungu**

1. Menyiapkan tanaman mangan ungu, memisahkan daun dari tanaman kemudian daun di bersihkan dengan air mengalir.
2. Daun dikering anginkan selama 2-3 hari.
3. Menimbang daun sebanyak 150 gram untuk semua konsentrasi.
4. Sample daun di lakukan maserasi dengan pelarut metanol selama 3 hari dan diaduk menggunakan shaker (Ariyanti,2017). Perbandingan pelarut dan daun adalah 1:2,5
5. Lalu difiltrasi menggunakan kertas saring whatmann 42. Filtrat yang didapatkan kemudian di sentrifuge dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit.
6. Supernatan dibuang dan pellet yang dihasilkan dipekatkan dengan metanol absolut 2 ml kemudian dilakukan pengujian metabolit sekunder dengan GCMS



### C. Perlakuan Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Maman Ungu

Daun maman ungu yang di ekstrak sebanyak 1500 g daun maman ungu segar dan diblender dalam 400 ml aquades, kemudian dimasukkan ke dalam baker glass berisi 600 ml aquades panas (suhu 100°C). kemudian direndam selama 48 jam. Ekstrak yang berwarna coklat kehitaman diperas dan disaring menggunakan kertas saring.

#### 1. Persiapan Perlakuan Berbagai Konsentrasi

Konsentrasi 50%: 1 ml ekstrak daun maman ungu + 1 ml aquades

Konsentrasi 75%: 1.5 ml ekstrak daun maman ungu + 0.5 ml aquades

Konsentrasi 100% : 2 ml ekstrak daun maman ungu

#### 2. Inokulasi Bakteri Uji Pada Media NA

- a) mengambil 200 µl suspensi bakteri: *R. solanacearum*, *Xanthomonas* sp. dan *E. carotovora* yang telah dihitung kepadatnya yaitu  $10^7$  CFU/ml
- b) kemudian ditanam dengan cara menuangkan ke atas permukaan lempeng agar yang sudah padat kemudian diratakan menggunakan pengaduk L
- c) meletakkan kertas saring steril diameter 5 mm ke atas permukaan media agar kemudian kertas saring ditetesi ekstrak daun maman ungu sebanyak 20µl sesuai perlakuan di inkubasi pada suhu 32°C selama 24 jam.

### 3.4. 7 Analisis Gas Chromatographi dan Mass Spektrometri (GC-MS)

Analisis GC-MS menggunakan GCMS- QP2010S Shimadzumass selective detector dengan kolom Rtx 5 MS (30 m x 0,25 mm, ketebalan lapisan 0,25  $\mu$ m). Sistem elektron ionisasi dengan energi ionisasi 70 eV digunakan untuk deteksi GC-MS. Helium pada flow rate 1,5 mL/menit digunakan sebagai gas pembawa. Temperatur kolom awal 70°C perlahan ditingkatkan sampai 300°C dengan peningkatan 5°C/menit. Kemudian ditahan selama 5 menit pada suhu 300°C. Kondisi GC-MS : suhu ion source 250° C dan suhu interface 305° C dengan cut time pelarut 3 menit. 1  $\mu$ l diinjeksikan secara manual dengan split ratio 1 : 50. Spektra massa yang dihasilkan dianalisis dengan jalan membandingkan kesamaan spektra massa masing-masing komponen yang diidentifikasi dengan spektra massa dari pustaka Wiley and NIST. Hasil ekstraksi dianalisis dengan GC-MS sebanyak 3 kali replikasi dengan replikasi pembacaan 2 kali seperti dideskripsikan oleh Khushnuma Maqbool (2014).

## 3.5 Variabel Pengamatan

### 3.5.1 Periode Inkubasi

Periode inkubasi yaitu waktu yang dibutuhkan oleh patogen mulai pada saat inokulasi hingga timbul infeksi. Pengamatan dilakukan setiap hari mulai dari inokulasi sampai tampak gejala pada tanaman. Perkembangan penyakit lalu diamati setiap hari berturut-turut selama 21 hari (Purnamasari *et al.*, 2014). Pengamatan dilakukan dengan cara mengamati daun layu yang ditandai memudarnya warna daun sampai berubah warna menjadi kuning dan pada akhirnya rontok. Pengamatan dilakukan dengan cara mengamati umbi busuk yang ditandai dengan berubahnya warna umbi menjadi kehitaman.

Benih masing-masing tanaman inang *R. solanacearum* dari tanaman tomat, *Xanthomonas* sp. diinokulasi dengan inokulum ketiga bakteri tersebut yang berupa suspensi. Suspensi bakteri tersebut (50 ml/tanaman untuk sekitar 1 kg tanah) disiramkan pada tanah di sekitar perakaran tanaman inang (Hartati, 2015).

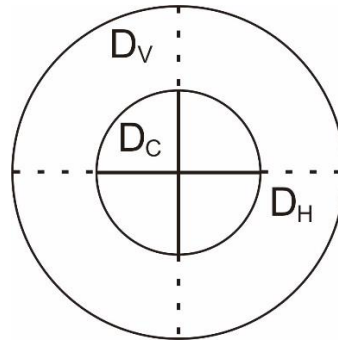
Perkembangan penyakit lalu diamati setiap hari berturut turut hingga gejala muncul. Gejala pada beberapa tanaman inang antara lain:

1. *Xanthomonas* sp. pengamatan dilakukan setiap hari hingga muncul gejala nekrosis yang menunjukkan bahwa isolat tersebut bakteri patogen tanaman.
2. *R. solanacearum* pengamatan dilakukan setiap hari hingga muncul gejala awal yang muncul pada tanaman tomat yaitu, daun mulai layu, kemudian daun berwarna kuning hingga seluruh daun menjadi kering
3. *E. carotovora* pengamatan dilakukan setiap hari hingga muncul gejala busuk lunak yang terjadi pada umbi wortel adalah berubahnya warna umbi menjadi lebih gelap yaitu kecoklatan.

### **3.5.2 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Maman Ungu**

#### **A. Diameter Zona Hambat**

Pengamatan dilakukan mengukur diameter zona penghambatan yang terbentuk di sekeliling cakram kertas saring yang telah direndam pada masing-masing ekstrak sesuai perlakuan. Zona penghambatan ditandai dengan adanya daerah bening di sekitar potongan kertas saring. Diameter zona penghambatan diukur berdasarkan nilai rata dari ukuran diameter yang terpendek dan terpanjang. Perhitungan zona hambat mengadopsi teknik yang digunakan oleh Manaroinson (2015) sebagai berikut :



Gambar 4. Perhitungan Zona Hambat

$$\text{Zona hambat} = \frac{(DV - DC) + (DH - DC)}{2}$$

Keterangan: DV : Diameter Vertikal

DH : Diameter Horizontal

DC : Diameter Cakram

Sumber : Manaroinson (2015)

a. Respon Hambatan Ekstrak Maman Ungu

Respon hambatan ditentukan berdasarkan kriteria (David Stout, 1971 dalam Simanjuntak *et al*, 2014) : sangat kuat (daerah hambat 20 mm atau lebih ), kuat ( daerah hambat 10-20), sedang (daerah hambat (5-10 mm) dan lemah ( daerah hambat <5mm)

b. Dokumentasi Hasil Uji

Pengamatan dilakukan dengan cara pengambilan gambar secara visual terhadap kemampuan zona hambat disetiap perlakuan dengan menggunakan kamera handphone.

### 3.6 Analisis dan Penyajian Data

Analisa data kualitatif pada uji hipersensitif dan uji patogenis dilakukan menggunakan metode deskriptif dengan standar deviasi. Analisa data kuantitatif pada uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode deskriptif dan uji F dimana berdasarkan kriteria respon hambatan data di Analisa dengan data di rata-rata kemudian data dilakukan dengan cara uji lanjut dengan uji tukey pada taraf  $\alpha = 5\%$ .

Hasil penelitian disimpulkan dari penafsiran data dan dokumentasi hasil uji aktivitas antibakteri.

